ALYTES

Bulletin trimestriel — Volume 4
Mars 1985 — Fascicule 1

Sur la structure génétique de deux "populations" allopatriques d'*Alytes obstetricans boscai* et d'*Alytes cisternasii* (Amphibia, Discoglossidae) du Portugal

Ana Maria VIEGAS & Eduardo Gonçalves CRESPO

Departamento de Zoologia e Antropologia,
Faculdade de Ciências de Lisboa,
58 rua Escola Politécnica, 1200 Lisboa, Portugal

ABSTRACT. - *The genetic structure of two allopatric populations of Portuguese frogs assignable to* Alytes obstetricans boscai *and* A. cisternasii *has been studied by analysis of 17 allozymic loci using starch gel electrophoresis. Genetic variability is surprisingly low in each, and only one locus in one population is polymorphic* (GOT_2 *of* A. cisternasii). *There are 9 loci that appear to discriminate the two populations. The calculated value for genetic distance D (NEI, 1972), is 0.73.*





INTRODUCTION

Durant ces dernières années, nous avons étudié divers aspects de la biologie des espèces ibériques d'*Alytes*, *Alytes obstetricans boscai* et *Alytes cisternasii* (CRESPO, 1979, 1981 a-c, 1982 a-d).

Au point de vue de la biogéographie, les éléments disponibles sur les aires actuelles de répartition des deux espèces et sur l'évolution historique de ces aires nous font admettre comme très probable qu'A. *cisternasii* se soit différencié à partir de populations ibériques d'A. *obstetricans* isolées au sud par les glaciations quaternaires.

A notre avis la différenciation adaptative d'A. *cisternasii* se serait centrée sur l'acquisition d'une capacité fouisseuse plus développée. C'est en effet de ce point de vue que nous pouvons interpréter la plupart des différenciations morphologiques (ostéologiques et myologiques) et même physiologiques de ces Amphibiens (CRESPO, 1979, 1981 a, c, 1982 a, e).

Bien qu'apparemment il n'y ait aucun facteur de nature temporelle (maturation des gamètes, périodes de reproduction) ou mécanique qui puisse empêcher l'hybridation des deux espèces au niveau d'éventuels contacts de leurs aires, nous n'avons jamais eu l'occasion de rencontrer dans la nature d'animaux qui, sur la foi de critères exclusivement morphologiques, seraient des hybrides. A ce sujet nous admettons que les différences observées entre les vocalisations des deux formes (CRESPO, 1981 b) peuvent constituer un facteur d'isolement reproductif assez efficace.

En outre, la comparaison du niveau de différenciation globale (morphologique, physiologique, biochimique, éthologique) de ces animaux avec d'autres paires d'espèces considérées comme phylogénétiquement proches (par exemple: *Discoglossus pictus* / *D. sardus*, *Hyla arborea* / *H. meridionalis*, *Bombina bombina* / *B. variegata*; voir CRESPO, 1979) aussi bien que les résultats des tests immunologiques effectués (CRESPO, 1976), indiquent un degré de différenciation spécifique bien marqué.

Au Portugal, A. *obstetricans* est réparti surtout dans les montagnes au nord du pays, alors qu'A. *cisternasii* se rencontre principalement dans les plaines du sud. A. *cisternasii* cependant s'étend au nord, à travers une bande orientale étroite, jusqu'à la région de Miranda do Douro, et A. *obstetricans* constitue un petit isolat au sud (Serra de S. Mamede, Portale-

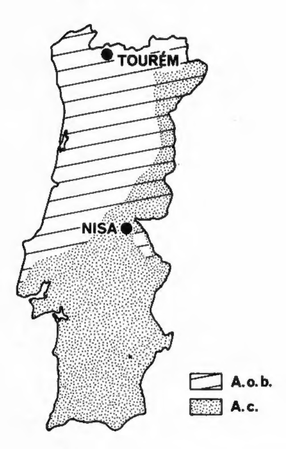


Fig. 1. - Aires de répartition et échantillons d'*Alytes obstetricans boscai* (A. o. b.) et d'*Alytes cisternasii* (A. c.) analysés.

gre) (CRESPO, 1979; MALKMUS, 1982, 1983) (fig. 1).

Dans ce travail préliminaire nous faisons la comparaison par électrophorèse en gel d'amidon de divers systèmes enzymatiques de deux échantillons, l'un d'A. *obstetricans*, l'autre d'A. *cisternasii*, en situation d'allopatrie bien marquée. Nous avons pour but l'obtention d'informations sur les systèmes distinctifs des deux formes et aussi sur la structure génétique (polymorphisme, hétérozygotie, etc.) de ces échantillons recueillis sur des aires relativement restreintes (d'environ 1 km²).

Les marqueurs biochimiques obtenus seront éventuellement utilisés pour des travaux ultérieurs à réaliser dans des zones où les deux espèces sont sympatriques.

MATERIEL ET METHODES

58 crapauds accoucheurs adultes ont servi à cette étude. Ils se répartissent ainsi: 29 A. *obstetricans* (20 mâles et 9 femelles) de Tourém (Province de Trás-os-Montes, nord du Portugal), 29 A. *cisternasii* (27 mâles et 2 femelles) de Nisa (Province de Alto Alentejo, centre-sud du Portugal). Les captures ont été effectuées, dans les deux cas, sur des aires d'1 km² à peu près. Au total nous avons analysé par électrophorèse en gel d'amidon 17 locus structuraux dont 16 codent des protéines enzymatiques et 1 seul code une protéine non-enzymatique (l'albumine).

Nous avons considéré que le codage génétique et la structure moléculaire des enzymes étudiés chez *Alytes* étaient semblables à celles des enzymes correspondants des autres Vertébrés.

En ce qui concerne la nomenclature des allèles (électromorphes) des gènes contrôlés, ils sont numérotés de la cathode vers l'anode en fonction de leur position sur le gel (c'est-à-dire le plus cathodique est l'allèle 1), principe adopté par divers auteurs (voir par exemple BOGART, 1982 et GYLLENSTEIN et al., 1983). Les animaux testés ont été anesthésiés à l'éther. Le sang a été recueilli dans des tubes capillaires après section du tronc artériel et le sérum séparé du caillot par centrifugation. Les organes prélevés après la prise du sang ont été stockés à -80°C avant le broyage. Celui-ci a été fait, en système réfrigéré, en tampon Tris-EDTA ajusté à pH 6,8 avec HCl concentré, contenant 10 mg de NADP par millilitre. Les broyats obtenus ont été alors centrifugés à 30000 g pendant 30 minutes et les surnageants respectifs ont été utilisés immédiatement après ou stockés à -80°C.

Les électrophorèses, en ce qui concerne les systèmes enzymatiques, se sont déroulées en gel d'amidon (Sigma) à 12 % préparé la veille des expériences. Des rectangles de papier Whatman n°3 (9 x 4 mm) ont été imbibés par les échantillons (homogénats d'organes). Les migrations ont été réalisées à la température de ± 4°C. Pour chaque gel nous avons testé simultanément 24 échantillons.

Les tampons d'électrophorèse sont indiqués dans le Tableau I et les techniques de coloration employées ont été celles préconisées par SELANDER et al. (1971), adaptées à notre matériel.

Pour le contrôle de l'albumine du sérum nous avons utilisé des bandes d'acétate de cellulose (Gelman), en tampon Tris-barbital à pH 8,8.

Tableau I. - Tissus et tampons utilisés pour l'étude des allozymes et de l'albumine des Alytes ibériques, A. *obstetricans boscai* et A. *cisternasii*. S: sérum; F: foie; M: muscle squelettique de la cuisse; C: coeur.

Systèmes protéiques[1]	Numéros de la Commission internationale d'enzymes	Locus	Tissus utilisés	Tampons (conditions expérimentales)
Lactate déshydrogénase	1.1.1.27	LDH_1 LDH_2	F; M C	Tris-citrate pH 8,0 (6 V/cm; 5 h)
Malate déshydrogénase	1.1.1.37	MDH_1 MDH_2	F; M	Tris-citrate pH 8,0 (6 V/cm; 5 h)
Isocitrate déshydrogénase	1.1.1.42	ICD_1 ICD_2	F	Tris-citrate pH 6,7 (6 V/cm; 5 h)
Phosphogluconate déshydrogénase	1.1.1.44	PGD	F	Tris-citrate pH 6,7 (6 V/cm; 5 h)
Glycérol-3-phosphate déshydrogénase	1.1.1.8	GPD_1 GPD_2	F	Tris-citrate pH 8,0 (6 V/cm; 5 h)
Glutamate-oxaloacétate transaminase	2.6.1.1	GOT_1 GOT_2	F	Tris-citrate pH 8,0 (6 V/cm; 5 h)
Superoxide dismutase	1.15.1.1	SOD^+	F	Tris-citrate pH 8,0 (6 V/cm; 5 h)
Phosphoglucomutase	2.7.5.1	PGM_1 PGM_2	F; M	Tris-citrate pH 6,7 (6 V/cm; 5 h)
Adénylate kinase	2.7.4.3	AK_1	F; M	Tris-citrate pH 6,7 (6 V/cm; 5 h)
Créatine kinase	2.7.3.2	CK	M	Tris-citrate pH 6,7 (6 V/cm; 5 h)
Albumine	-	ALB	S	Tris-barbital pH 8,8 (40 mn)

1. Terminologie selon HARRIS & HOPKINSON (1976) et DIXON & WEBB (1979). Techniques de coloration selon SELANDER et al. (1971) adaptées à notre matériel.

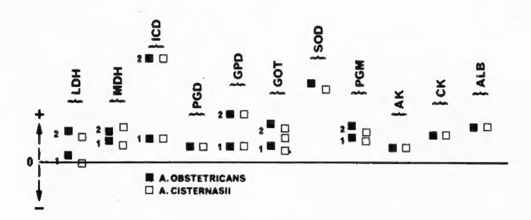


Fig. 2. - Représentation graphique des électromorphes obtenues pour chacun des systèmes protéiques étudiés.

Les migrations se sont effectuées à la température ambiante et pour la coloration on a employé le noir d'amidon.

RESULTATS

Les résultats obtenus sont synthétisés dans le Tableau II. Les variantes alléliques (électromorphes) rencontrées sont définies par leur mobilité électrophorétique en attribuant la valeur 100 à l'allèle le plus fréquent chez *Alytes obstetricans*.

Les électromorphes obtenues pour chacun des systèmes protéiques étudiés, dans les conditions expérimentales décrites ci-dessus, sont représentées sur la fig. 2.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les allèles (électromorphes) suivants sont diagnostiques pour les deux "populations" d'*Alytes* étudiées: LDH_1, LDH_2, MDH_1, MDH_2, GOT_1, GOT_2, PGM_2 et SOD^+; sont communs: GPD_1, GPD_2, ICD_1, ICD_2, PGD, AK_1, CK et ALB. Les deux populations diffèrent donc par 8 locus sur les 17 analysés.

Tableau II. - Fréquences alléliques et taux d'hétérozygotie (par locus) de 17 locus de deux échantillons des espèces portugaises d'Alytes: A. *obstetricans boscai* et A. *cisternasii*. N: nombre d'individus; L: nombre de locus; x, y: fréquences alléliques; $H = 1 - \Sigma x^2$ (ou y^2): hétérozygotie par locus.

Locus	Allèles	A. *obstetricans* (N = 29; L = 58) x	H	A. *cisternasii* (N = 29; L = 58) *y*	H
LDH_2	75 100	0 1,0	0	1,0 0	0
LDH_1	-10 100	0 1,0	0	1,0 0	0
MDH_2	105 100	0 1,0	0	1,0 0	0
MDH_1	70 100	0 1,0	0	1,0 0	0
ICD_2	100	1,0	0	1,0	0
ICD_1	100	1,0	0	1,0	0
PGD	100	1,0	0	1,0	0
GPD_2	100	1,0	0	1,0	0
GPD_1	100	1,0	0	1,0	0
GOT_2	65 80 100	0 0 1,0	0	0,74 0,26 0	0,385
GOT_1	75 100	0 1,0	0	1,0 0	0
SOD^+	90 100	0 1,0	0	1,0 0	0
PGM_2	85 100	0 1,0	0	1,0 0	0
PGM_1	85 100	0 1,0	0	1,0 0	0
AK_1	100	1,0	0	1,0	0
CK	100	1,0	0	1,0	0
ALB	100	1,0	0	1,0	0

Si l'on admet que les gènes considérés sont représentatifs de la totalité des deux génomes comparés, nous pouvons appliquer, pour obtenir une quantification du degré d'identité génétique des deux échantillons, la formule de NEI (1972) qui nous donne le coefficient d'identité génétique, I, entre les deux espèces pour tous les locus étudiés:

$$I = \frac{Jxy}{\sqrt{Jx\ Jy}}$$

où Jxy est la moyenne arithmétique des $j_{xy} = \Sigma\, x_i\, y_i$ sur l'ensemble des locus, Jx la moyenne arithmétique des $j_x = \Sigma\, x_i^2$ et Jy la moyenne arithmétique des $j_y = \Sigma\, y_i^2$, x_i et y_i représentant les fréquences respectives du i^{ème} allèle dans les deux populations X et Y comparées. Ce coefficient peut aussi se traduire en distance génétique, D, correspondante: $D = -\log I$.

En ce qui concerne les deux populations d'*Alytes* analysées, $I = 0{,}48$ et $D = 0{,}73$.

Ces valeurs sont indicatrices d'une différenciation génétique bien marquée entre les deux espèces (voir: DAVIDIAN-BRITTON, 1978; FATIMA, 1979; PASTEUR & PASTEUR, 1980; GUILLAUME & LANZA, 1982). La distance génétique, D, est toutefois plus grande que celle que nous pouvions attendre, compte tenu du niveau global de la différenciation morpho-physiologique et éthologique de ces Amphibiens. Cependant d'autres exemples sont déjà connus qui nous suggèrent l'existence d'une remarquable indépendance entre l'évolution protéique et l'évolution de l'organisme (voir par exemple MAXSON & WILSON, 1974, 1975).

Le seul locus polymorphe (en considérant comme polymorphe tout locus où l'allèle le plus fréquent a une fréquence inférieure à 99 %) est celui de la GOT_2 d'*A. cisternasii*. La population de Nisa n'est cependant pas en équilibre de HARDY-WEINBERG pour ce locus ($X^2 = 8{,}62$ pour 2 degrés de liberté, soit $P < 0{,}05$); le taux d'hétérozygotie de ce locus étant de 0,385, 38,5 % des individus trouvés dans la nature devraient être hétérozygotes, s'il y avait panmixie. En réalité nous avons trouvé seulement 5 individus, tous mâles, hétérozygotes sur 29 individus observés (soit 17,24 %). Il y a un déficit modéré d'hétérozygotes ($X^2 = 3{,}43$ pour 1 degré de liberté, soit $0{,}05 < P < 0{,}1$), ce qui n'est pas rare d'ailleurs dans plusieurs populations sauvages, en particulier de micromammifères (DAVIDIAN-BRITTON, 1978).

L'hétérozygotie moyenne par locus (coefficient de diversité génétique) est de 2,3 % chez *A. cisternasii* et nulle chez *A. obstetricans*. De la

même façon le nombre moyen d'allèles par locus (rapport du nombre d'allèles à chaque locus sur le nombre total de locus analysés) est de 1,06 chez *A. cisternasii* et évidemment de 1,0 chez *A. obstetricans* ("population" homoallélique pour tous les locus).

La variabilité génétique, au sein de chacune des populations d'*Alytes*, est étonnamment basse, compte tenu des valeurs rencontrées chez d'autres Amphibiens déjà étudiés (sur le polymorphisme: voir PASTEUR, 1974; sur l'hétérozygotie: voir AYALA, 1977).

On ne peut pas tenter d'expliquer ce fait par l'insuffisance de l'échantillonnage, car l'ensemble des locus analysés, bien qu'il ne soit pas très grand, est cependant suffisant, en considérant le nombre d'individus testés, pour nous donner une estimation significative de la variabilité génétique des deux échantillons (voir GORMAN & RENZI, 1979).

La possibilité d'existence d'une corrélation entre la faible variabilité génétique des deux populations et les caractéristiques de "stabilité - instabilité" des milieux où ils vivent doit être considérée, notamment à la lumière de la récente controverse à ce sujet (voir : GOOCH & SCHOPF, 1972; SOMERO & SOULE, 1974; AYALA et al., 1975; HEDRICK, GINEVAN & EWING, 1976; PASTEUR, 1985). Toutefois, il nous semble que ces milieux présentent, dans le contexte du pays, des caractéristiques "moyennes" en ce qui concerne leurs niveaux d'hétérogénéité climatique et biotique.

En outre, il n'est pas évident qu'existent des barrières géographiques ou écologiques importantes, susceptibles d'isoler les populations d'autres populations conspécifiques. On sait cependant que ces animaux, bien que dispersés sur des aires relativement vastes, constituent fréquemment des petits noyaux assez localisés (fragmentation de l'aire de répartition). Il est probable que dans ces circonstances le flux génétique entre les divers noyaux puisse être réduit pendant des périodes plus ou moins prolongées.

Si de telles réductions du flux génétique ont effectivement lieu, elles sont certainement susceptibles de déterminer des réductions épisodiques de la variabilité génétique intra-populationnelle, par effet de "goulot" et/ou "fondateur". Au contraire on pourrait observer une augmentation relative de la variabilité génétique inter-populationnelle.

Pour mieux éclaircir ce sujet il faudra étudier des échantillons d'autres localités.

REMERCIEMENTS

Nous remercions les Docteurs Nicole PASTEUR, Djoko ISKANDAR et Claude GUILLAUME pour leur précieuse collaboration pendant le stage réalisé par l'un de nous au Laboratoire d'Evolution des Vertébrés (Université Montpellier II), qui nous a permis la mise au point des techniques employées dans ce travail. Nous remercions aussi les lecteurs du texte pour leurs suggestions pertinentes, ainsi que M. le Docteur Georges PASTEUR pour avoir mis à notre disposition le manuscrit de son travail sous presse cité dans la bibliographie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AYALA, F. J., 1977. - Variation génétique et évolution. *La Recherche*, *8* (81): 736-744.

AYALA, F. J., VALENTINE, J. W., HEDGECOCK, D. & BARR, L. G., 1975. - Deep-sea asteroids: high genetic variability in a stable environment. *Evolution*, *29*: 203-212.

BOGART, J. P., 1982. - Ploidy and genetic diversity in Ontario salamanders of the *Ambystoma jeffersonianum* complex revealed through an electrophoretic examination of larvae. *Canad. J. Zool.*, *60*: 848-855.

CRESPO, E. G., 1976. - Contribuição para o estudo das espécies ibéricas do género *Alytes* (*Alytes cisternasii* Boscá e *Alytes obstetricans boscai* Lataste)(Amphibia, Salientia). I. Testes de precipitação e electroforéticos. *Bolm. Soc. port. Ciênc. nat.*, *17*: 39-54.

----- 1979. - *Contribuição para o conhecimento da biologia dos* Alytes *ibéricos,* Alytes obstetricans boscai *Lataste, 1879 e* Alytes cisternasii *Boscá, 1879 (Amphibia - Salientia): a problemática da especiação de* Alytes cisternasii. Tese, Univ. Lisboa: i + 1-399, 124 pl., 12 tabl.

----- 1981 a. - Contribuição para o conhecimento da biologia dos *Alytes* ibéricos, *Alytes obstetricans boscai* Lataste, 1879 e *Alytes cisternasii* Boscá, 1879 (Amphibia, Salientia). Tegumento (histologia e polipeptidos activos). *Arq. Mus. Boc.*, (C), *1* (2): 33-56.

----- 1981 b. - Contribuição para o conhecimento da biologia dos *Alytes* ibéricos, *Alytes obstetricans boscai* Lataste, 1879 e *Alytes cisternasii* Boscá, 1879 (Amphibia, Salientia). Emissões sonoras. *Arq. Mus. Boc.*, (C), *1* (3): 57-76.

----- 1981 c. - Contribuição para o conhecimento da biologia dos *Alytes* ibéricos, *Alytes obstetricans boscai* Lataste, 1879 e *Alytes cisternasii* Boscá, 1879 (Amphibia, Salientia). Regulação hidríca (balanço osmótico). *Arq. Mus. Boc.*, (C), *1* (4): 77-132.

----- 1982 a. - Contribuição para o conhecimento da biologia das espécies ibéricas de *Alytes*, *A. obstetricans boscai* Lataste, 1879 e *A. cisternasii* Boscá, 1879 (Amphibia, Discoglossidae): morfologia dos adultos e dos girinos. *Arq. Mus. Boc.*, (C), *1* (7): 255-312.

----- 1982 b. - Contribuição para o conhecimento da biologia das espécies ibéricas de *Alytes*, *A. obstetricans boscai* Lataste, 1879 e *A. cisternasii* Boscá, 1879 (Amphibia, Discoglossidae): desenvolvimento embrionário e larvar. *Arq. Mus. Boc.*, (C), *1* (8): 313-352.

----- 1982 c. - Contribuição para o conhecimento das espécies ibéricas de *Alytes*, *A. obstetricans boscai* Lataste, 1879 e *A. cisternasii* Boscá,

1879 (Amphibia: Discoglossidae): ciclos espermatogenéticos e ováricos. *Arq. Mus. Boc.*, (C), *1* (9): 353-379.

----- 1982 d. - Contribuição para o conhecimento das espécies ibéricas de *Alytes*, *A. obstetricans boscai* Lataste, 1879 e *A. cisternasii* Boscá, 1879 (Amphibia: Discoglossidae): ovos, posturas (épocas de reprodução). *Arq. Mus. Boc.*, (C), *1* (20): 453-466.

----- 1982 e. - Sur la biologie évolutive des *Alytes* ibériques. *Bull. Soc. herp. Fr.*, 22: 38-41.

DAVIDIAN-BRITTON, J., 1978. - *Premières données sur la structure génétique du complexe d'espèces de* Mus musculus *L. dans le bassin méditerranéen.* Montpellier, Thèse Univ. Sc. Techn. du Languedoc: i-iii + 1-67, 4 pl.

DIXON, M. & WEBB, E. C., 1979. - *Enzymes* (3rd ed.). London, Longman: i-xxiv + 1-1116, 2 pl.

FATIMA, B., 1979. - *Premier apport de la génétique biochimique des populations à la systématique des mulots (genre* Apodemus, *Rodentia) de France continentale et de quelques autres régions.* Montpellier, Thèse Univ. Sc. Techn. du Languedoc: 1-57, 7 pl.

GOOCH, J. L. & SCHOPF, T. J. M., 1972. - Genetic variability in the deep-sea: relation to environmental variability. *Evolution*, *26*: 545-552.

GUILLAUME, C. P. & LANZA, B., 1982. - Comparaison électrophorétique de quelques espèces de Lacertidés méditerranéens, *Genera Podarcis* et "*Archaeolacerta*". *Amphibia-Reptilia*, *3*: 361-375.

GYLLENSTEIN, U., RYMAN, N., REUTERWALL, C. & DRATCH, P., 1983. - Genetic differentiation in four European subspecies of red deer (*Cervus elaphus* L.). *Heredity*, *51*: 561-580.

HARRIS, H. & HOPKINSON, D. A., 1976. - *Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics*. Amsterdam, North-Holland. Publ. Co.

HEDRICK, P. W., GINEVAN, M. E. & EWING, E. P., 1976. - Genetic polymorphism in heterogeneous environments. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, *7*: 1-32.

MALKMUS, R., 1982. - Beitrag zur Verbreitung der Amphibien und Reptilien in Portugal. *Salamandra*, *18* (3/4): 218-299.

----- 1983. - Nachtrag zur Verbreitung der Amphibien und Reptilien Portugals. *Salamandra*, *19* (1/2): 71-83.

MAXSON, L. R. & WILSON, A. C., 1974. - Convergent morphological evolution detected by studying proteins of tree frogs in *Hyla eximia* species group. *Science*, *185*: 66-68.

----- 1975. - Albumin evolution and organismal evolution in tree frogs (Hylidae). *Systematic Zoology*, *24*: 1-15.

NEI, M., 1972. - Genetic distance between populations. *Amer. Natur.*, *106*: 283-292.

PASTEUR, G., 1974. - Génétique biochimique et populations, ou: pourquoi sommes-nous multi-polymorphes? *Mém. Soc. zool. Fr.*, *37*: 473-531.

----- 1985. - Les paramètres statistiques communément utilisés dans l'exploitation des résultats de l'électrophorèse des protéines et leur avenir systématique. *Mém. Soc. zool. Fr.*, *41*, sous presse.

PASTEUR, G. & PASTEUR, N., 1980. - Les critères biochimiques et l'espèce animale. *Mém. Soc. zool. Fr.*, *40*: 99-150.

SELANDER, R. K., SMITH, M. H., YANG, S. Y., JOHNSON, W. E. & GENTRY, G. B., 1971. - Studies in genetics. 6. Biochemical polymorphism and systematics in the genus *Peromyscus*. I. Variations in old-field mouse (*Peromyscus polionotus*). *Univ. Texas Publ.*, 7103: 49-90.

SOMERO, G. N. & SOULE, M., 1974. - Genetic variation in marine fishes as a test of niche-variation hypothesis. *Nature*, *249*: 670-672.